

A reelin expresszió szerepe az otosclerosis patogenezisében

Csomor Péter dr.¹, Liktó Balázs dr.², Sziklai István dr.¹, Karosi Tamás dr.¹

¹DEBRECENI EGYETEM OEC, FÜL-ORR-GÉGÉSZETI ÉS FEJ-NYAKSEBÉSZETI KLINIKA, DEBRECEN

²BAJCSY-ZSILINSZKY KÓRHÁZ, FÜL-ORR-GÉGE OSZTÁLY, BUDAPEST

ÖSSZEFOGLALÁS

Háttér és előzmények: Az otosclerosis kialakulásában számos genetikailag meghatározott tényező játszhat szerepet. Korábban több tanulmány is megerősítette a RELN gén betegség-specifikus polimorfizmusát és a reelin adhézis fehérje fokozott kifejeződését stapes ankylosis betegekben. Azonban a RELN/reelin-rendszer funkciójából adódóan, a reelin fehérje kizárólag neurális elemekben és az odontoblastokban fejeződik ki.

Módszerek: Az ankyloticus stapes talpakban (n=85) és a kontrollként felhasznált corticalis csontfragmentumokban (n=4), hallócsontokban (n=2) valamint emberi agyszövet mintákban (n=4) előkészítést követően RELN-specifikus RT-PCR és reelin-specifikus immunfluoreszcens (IFA) vizsgálatokat végeztünk.

Eredmények: Az ankyloticus stapes talpak első csoportjában (n=22) egyértelmű reelin fehérje kifejeződést találtunk, azonban az RT-PCR csoportban (n=63) a RELN-specifikus mRNS kimutathatatlant volt. A pozitív kontrollként használt agyszövet mintákat kifejezetten magas reelin fehérje- (n=2) és RELN-specifikus mRNS (n=2) expresszió jellemezte. A csontspecifikus kontroll mintákban (n=6) sem reelin, sem RELN mRNS expressziót nem tapasztaltunk.

Következtetések: A felnőtt betegekből származó stapes mintákban a RELN gén nem mutat aktív, mRNS-szintű expressziót. A reelin fehérje kimutathatósága, az adhézis molekula embrionális fejlődésben betöltött szerepére hívja fel a figyelmet. A capsula otica ugyanis körülvéve a neurális elemként szereplő hártás labyrinthust, jelentős szerepet játszhat a szinapszisképződés embrionális koordinációjában. A capsula otica részeként szereplő stapes talp RELN/reelin expressziós profilja a fentiek ismeretében nem meglepő, az otosclerosisban betöltött szerepe azonban kérdéses.

KULCSSZAVAK

BETEGSÉG-ASSZOCIÁCIÓ, OTOSCLEROSIS, OTOSCLEROSIS GÉNEK, PATOGENEZIS, RELN, REELIN

The role of reelin the pathogenesis of otosclerosis

SUMMARY

Hypothesis: Several studies have reported a potential genetic association between diseases-specific SNPs of RELN and otosclerosis and confirmed RELN expression in human stapes footplates. These are conflicting results, since RELN expression has been discussed exclusively in neural tissues and in odontoblasts. **Background:** Otosclerosis is a disease of complex bone remodeling disorder, which is limited to the human otic capsule. Genetic background of otosclerosis has long been suspected, however the pathogenesis remained unclear.

Methods: Ankylotic stapes footplates (n=85), cortical bone fragments (n=4), hearing ossicles (n=2) and human brain tissue specimens (n=4) were processed to RELN-specific RT-PCR and reelin-specific immunofluorescent assay (IFA).

Results: The first group of ankylotic stapes footplates (n=22) showed a consistent positive reaction against reelin by IFA, however; RELN-specific mRNA could not be detected in the second, RT-PCR group (n=63). Brain specimens were characterized by robust expression of reelin (n=2) and RELN-specific mRNA (n=2). In case of bone-specific controls (n=6), reelin/RELN expression was excluded obviously.

Conclusion: As to current observations, RELN gene does not show active expression in adult stapes footplates. Since, the otic capsule surrounds a special neural structure (membranous labyrinth), reelin might play a coordinative role in the early embryonic stage of development. As being a part of the otic capsule, stapes footplate might be characterized by persisting reelin detectability without mRNA expression. Between these conditions, the etiologic role of RELN is questionable in the pathogenesis of otosclerosis.

KEYWORDS

DISEASE-ASSOCIATION, OTOSCLEROSIS, OTOSCLEROSIS GENES, PATHOGENESIS, RELN, REELIN

Az otosclerosis a felnőttek viszonylag gyakori hallászavara, amelyet az oticus capsulában zajló, patológiásan felfokozott csontátépülés okoz (1). Az otosclerosis progresszív vezetékes – és gyakran szenzorineurális – halláscsökkenéssel (CHL, SNHL) jár, amely a stapes talp fixációjának és a pericochleárisan zajló osteolysisnek a következménye (1). Az északi (Európa, Amerika) fehér populációban a manifest otosclerosis prevalenciája a teljes populációt tekintve 0,3-0,4%-ra tehető, ezzel szemben a különböző okból kialakult halláscsökkenések között 5-9%-os, míg a vezetékes halláscsökkenések között 18-22%-os előfordulási gyakoriságot mutat (1). Az otosclerosis-hoz hasonló, illetve otosclerosis-szerű csontléziók lényegesen gyakrabban találhatók meg a capsula oticában. Ez az ún. szövettani otosclerosis, amely klinikai tüneteket rendszerint nem okoz, a góccok némák maradnak. Nagy, nem-válogatott boncolási adatbázisokban a szövettani otosclerosis előfordulási gyakorisága 8-11% közé esett (1). A vezetékes halláscsökkenést okozó, stapes ankylosissal járó megb-

Levelező szerző:

Dr. Karosi Tamás PhD, egyetemi tanársegéd
Debreceni Egyetem OEC,
Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Klinika,
4032, Debrecen, Nagyerdei Krt. 98.,
Tel./fax: 0036(52) 255-805, 255-809
Mobil: 0036(20) 969-0590
Email: karositamas@gmail.com, Web: www.earpathology.eu

tegedések között az otosclerosis mintegy 70%-os előfordulásaival lehet számolni (2). Amennyiben egyszerűsíteni kívánjuk a stapes ankylosis klinikai definícióját, elmondhatjuk, hogy az otosclerosis alapvetően stapes fixáció, azonban a stapes fixáció ténye önmagában nem erősíti meg az otosclerosis diagnózisát: etiológiája egészen más is lehet (2). Tekintettel arra, hogy az otosclerosis és nem-otosclerosis stapes fixációk klinikai módszerekkel élesen nem elkülöníthetőek, a differenciáldiagnózisuk jelenleg is a stapedectomy során eltávolított stapes talpak kórszövettani vizsgálatán alapul (2). Az elmúlt évek, évtizedek intenzív kutatásai ellenére az otosclerosis etiopatogeneze tisztázatlan maradt. Számos hipotézis született azonban a betegség virális, autoimmun, endokrin és genetikai eredetét illetően (3, 4, 5, 6, 7, 8). Sajnos mindebből az is következik, hogy az irodalomban számos egymásnak gyökeresen ellentmondó megfigyelés és állítás létezik az otosclerosis kapcsolatban (9, 10).

Az otosclerosis genetikai hátterét az elmúlt évtizedekben számos kutatócsoport tanulmányozta behatóan, azonban egyértelmű célgéneket, illetve betegség-specifikus mutációkat nem sikerült azonosítani (11). Korábban több tanulmány közölt adatokat genetikai asszociációkról olyan populációkban, ahol a stapes fixáció halmozottan fordult elő, azonban az eltávolított stapes talpak kórszövettani vizsgálatát sebésztechnikai és koncepcionális okokból nem végezték el (12, 13). Összefoglalva, ezek a tanulmányok a stapes ankylosis klinikai és intraoperatív diagnózisa, valamint az otosclerosis között egyenlőségjelet tettek, figyelmen kívül hagyva a nem-otosclerosis stapes fixációk lehetőségét (1, 14, 15). A legtöbb genetikai tanulmány, amelyet stapes fixációban szenvedő családokon és nagy, nem szelektált populációkban végeztek, végső soron autoszomális domináns öröklésmenetet talált, amelyet 40-45%-os inkomplett penetrancia jellemzett (11, 13). A genetikai kapcsoltsági tanulmányok nyolc otosclerosis-specifikus génlókusz (OTSC1-8) jelenlétét igazolták, amelyek egyenként a 15q, 7q, 6p, 16q, 3q, 6q és a 9p, kromoszómákon helyezkednek el (11, 12, 13, 14, 15). Ezeket a lokuszokat ugyan feltérképezték és az otosclerosisához kapcsolták, azonban egyetlen specifikus gént, illetve génterméket sem sikerült azonosítani: így az betegség genetikai-molekuláris biológiai hátteréről vajmi kevés információ van (11, 12, 13, 14, 15). A genetikai kutatások későbbi célpontjait az „egyszerű” gének (single genes) jelentették. Több tanulmány megerősítette, hogy a COL1A1 (I. típusú kollagén, A1-allél), a BMP2, a BMP4 (Bone Morphogenetic Protein 2 és 4), a TGFBI (Transforming Growth Factor-Beta 1) és a RELN gének szerepet játszhatnak az otosclerosis etiopatogenezésében (3, 4, 16, 17, 18). Ezeket az összefüggéseket retrospektíve elemezve azonban elmondhatjuk, hogy a fenti génekben bekövetkező mutációk, illetve allélfrekvencia változások csak a stapes ankylosis esetek viszonylag kis hányadáért lehetnek felelősek (3, 18). Mindezen túl, a korábban leírt genetikai asszociációk nem képesek magyarázni az otosclerosis fenotípusos jellegzetességeit, mint pl. a női dominancia, a felnőttkori kezdet, a szerspecifititás és a gyulladásos alapon létrejött csontremodellációs zavar (1).

A RELN gén SNP-i (single-nucleotide polymorphism) és az otosclerosis között megfigyelt etiológiai kapcsolat tűnik az egyik legérdekesebb összefüggésnek, hiszen a reelin fehérje kizárólag neurális eredetű szövetekben fejeződik ki (18, 19, 20). A RELN gén a 7q22.1 kromoszómán helyezkedik el és 64 aktív exonnal rendelkezik (21). Maga a RELN egy extrém nagyméretű extracelluláris mátrixfehérjét kódol, amelyet reelinnek neveznek (21, 22). A reelin egy speciális ún. „decoy” (horgonyzó) receptornak tartják, amely az elsődleges neuronális és neuroglialis interakciókat szabályozza az emberi agy fejlődése során bekövetkező neuron migrációban és sinapszisképződésben (19, 21, 22). A reelinnek szerin-proteáz aktivitása is van, amely fontos a sejtdifezialis folyamatok modulálásában (22). A reelin a VLDL recep-

torokhoz (Very Low Density Lipoprotein Receptor) és az ApoE2 receptorokhoz (Apolipoprotein-E Receptor 2) kötődve, kiváltja a Tau és Dab1 fehérjék tirozin-foszforillációját, jelentős hatást gyakorolva ezzel a neuronális mikrotubulus képződésre (22). A RELN gén mRNS-ről két alternatív splicing variáns képződik (variáns 1 [NM_005045.3] és 2 [NM_173054.2]), amelyek némileg különböző reelin izoformákat kódolnak (izoforma a [NP_005036] és b [NP_774959]) (21). Más transzkripció variánsokat is közöltek már, de ezek teljes szerkezete és funkciója nem ismert pontosan (21). A reelin fehérje szerkezeti anomáliái különböző neuro-pszichiátriai kórképekben játszhatnak etiológiai szerepet, mint például a skizofrénia, autizmus, bipoláris zavar, major depresszió és a temporális lebeny epilepszia (23, 24, 25, 26). Egyes tanulmányok szerint a skizofrénia és a bipoláris zavarok esetén a reelin expresszió szignifikánsan csökkent az agykéregben, azonban ezek a megfigyelések még nem tisztázottak, hiszen más tanulmányok azt igazolták, hogy a fenti betegségek kezelésére alkalmazott pszichotróp szerek önmagukban is csökkentik a RELN mRNS expressziót (22, 25). Jelen ismereteink szerint, a reelin kizárólag neurális szövetekben (ganglionok, agy, kisagy) expresszálódik, más szövettípusokban vagy nem fejeződik ki vagy a kimutathatóság határán van (19, 20, 22). A reelin az embrionális fejlődés során az odontoblastok is expresszálják, amelyek éretlen sejtek a gyökércsatorna-pulpa határon (27). Szerepük a dentin felépítése és az érzőidegrostok migrációjának elősegítése a pulpa felől (27).

A RELN polimorfizmus (SNP) etiológiai szerepe az elmúlt években vetődött fel az otosclerosis patogenezisében (18). A fenti megállapításokkal szemben állva, *Van Camp és kutatócsoportja* statisztikailag szignifikáns összefüggést talált a RELN gén SNP polimorfizmusa és az otosclerosis patogenezise között (18). *Schrauwen és munkatársai* egy teljes genomot lefedő asszociációs tanulmányt közöltek, amelyben 555.000 SNP-t vizsgáltak az otosclerosis kialakulásának rizikóját illetően egy belga-holland-francia vegyes populációban (18). Két otosclerosis szorosan asszociált SNP-t találtak, amelyek a 7q22.1 kromoszómán helyezkednek el, pontos lokalizációjukat tekintve pedig a RELN gén 1-4 intronjainak felelnek meg (18). Érdekes módon, a szerzők megerősítették a RELN mRNS és a reelin fehérje expresszióját a belsőfülben és az emberi (egészséges) stapes talpakban is (18). Később, *Schrauwen és munkatársai* nagyon hasonló következtetésekre jutottak az SNP asszociációkat és a RELN gén allélikus heterogenitását illetően többszörös európai populációkban is (28). Ezen tanulmányok legfőbb ereje a vizsgált vérminták (nem stapes minták!) relatíve nagy számában rejlik (n=1141), amit klinikailag stapes fixációban szenvedő betegektől nyertek (28). Az előző eredményekkel összefüggésben, *Khalfallah és munkatársai* ugyanezeket a megfigyeléseket tették egy kisebb tunéziai, klinikailag „otosclerosisos” beteganyagban (29). A szerzők emellett leírtak egy újabb SNP asszociációt a 11q13.1 kromoszómaregióban, amelynek jelentősége tisztázatlan (29). Mindezek mellett, *Khalfallah és munkatársai* az is megfigyelték, hogy a RELN gén rs3914132 jelű SNP-je szignifikáns összefüggést mutat a női nemmel, érzékelte ezzel a RELN potenciális szerepét az otosclerosisban tapasztalt női dominanciában (29).

Jelen tanulmány a RELN mRNS és a reelin expressziós szintjeit, valamint mintázatát vizsgálja emberi ankyloticus stapes talpakban, csontspecifikus kontroll mintákban és az emberi agyban. Eredményeink megkérdőjelezzik a RELN potenciális szerepét az otosclerosis patogenezisében.

Anyagok és módszerek

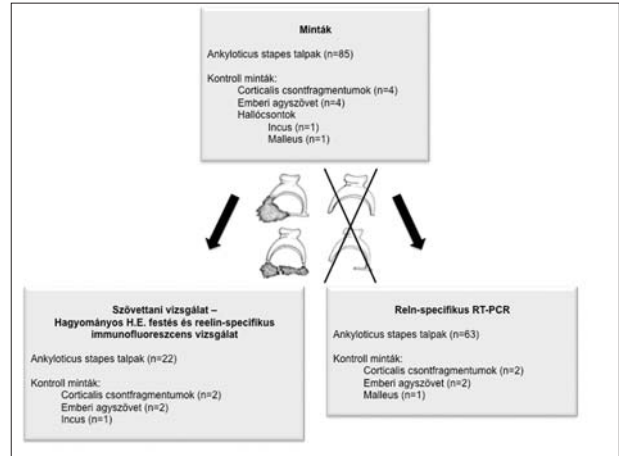
Betegek és kontroll szövetminták

A tanulmány sematikus szerkezetét az 1. ábrán mutatjuk be. Nyolcvanöt stapedectomy során eltávolított ankyloticus stapes

talp mintát vizsgáltunk (n=85, férfiak=32, nők=53). A betegek átlagéletkora 42,11 év volt (tartomány=25-63 év). Az 1000 Hz-es frekvencián mért csont-légköz érték minden esetben elérte vagy meghaladta a 30 dB-t. A műtési indikációt szintén alátámasztotta az 1024, illetve a 2048 Hz-es hangvillával végzett Rinné-próba negativitása. A stapes fixáció 23 betegben kétoldalinak bizonyult, azonban a rövid vizsgálati periódusban minden betegből csak egy stapes talp mintát elemeztünk az egyoldali stapedectomy miatt. A stapes talpak RELN expressziójának szövetspecifikus kontrolljaként corticalis csontmintákat (n=4, lateralis atticotomia), egy incus és egy malleus mintát alkalmaztunk, amelyeket radicalis fülműtétek során távolítottunk el. A RELN expresszió pozitív kontrolljaként cadaverekéből származó agymintákat (n=4, férfiak=3, nők=1) alkalmaztunk a RELN-specifikus RT-PCR és az immunfluoreszcens vizsgálatok során. A cadaver mintákat a halál beálltát követő 10 órán belül távolítottuk el. A pozitív kontrollok átlagéletkora 55,85 év volt (tartomány=49-63 év). A stapes- és kontroll szövetmintákat 2010 februárja és 2010 októbere között gyűjtöttük (DEOEC, Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Klinika; DEOEC, Patológiai Intézet; Bajcsy-Zsilinszky Kórház, Fül-Orr-Gége Osztály). A tanulmányt a Tudományos Kutatási Bizottság az ETT-TUKEB/2008-113-547/89 nyilvántartási számon engedélyezte. A klinikai minták felhasználása előtt minden beteg tájékoztató-beleegyező nyilatkozatot írt alá. A vizsgálatot a Helsinki Deklaráció alapelveinek megfelelően végeztük el.

RNS extrakció és RELN mRNS-specifikus RT-PCR

Az ankyloticus stapes minták egyik részét (n=63), a corticalis csontmintákat (n=2), a malleust (n=1) és az agyminták felét (n=2) sterilizált szilikonszövetekben (Eppendorf-tubus) tároltuk -70 °C-os hőmérsékleten (1. ábra). Az egyedi szövetmintákat folyékony nitrogénben fagyasztottuk, majd sterilizált száraz porcelán dörzscsészékben porítottuk. A porított szöveteket DEPC (diethyl-piropikarboxonát) kezelt desztillált vízben szuszpendáltuk. A homogenizált szövetsuszpenziókból a teljes RNS tartalmat kivontuk, amelyhez a TRI Reagent™ oldatot (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.) használtuk fel. Az RNS extrakció során mindenben a gyártó utasításainak megfelelően jártunk el. A reverz transzkripciót 1 µg teljes RNS-en végeztük el 20 µl végtérfofogóban. A reverz transzkripció során a High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit™-et (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) alkalmaztuk hexagonális random primerek felhasználása mellett. A RELN-specifikus primereket az online Primer-BLAST™ szoftverrel (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) terveztük és választottuk ki úgy, hogy a kereső- és tervezőrendszerbe a RELN gén 1. transzkripció variánsának mRNS szekvenciáját (NM_005045.3, GI: 223718138) tápláltuk be. A cDNS PCR (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) során olyan RT-primereket (Reln-7F 5'-3': GGA CCA TGT GGA GGT CGT CCT AGT A, GC%=56, Tm=58,8°C és Reln-7R 5'-3': CAC TCG GTC TTG AGA AGG GCT TTC, GC%=54,17, Tm=57,5°C) használtunk, amelyek a RELN mRNS 3' végét célozzák. A primer tervezés során becsült termékméret 264 bázispárnak adódott. Az amplifikációs reakciókat 25 µl végtérfofogóban végeztük. Az amplifikációs reakcióelegy tartalma: 1 × PCR puffer, 1,5 mM MgCl₂, 100 µM dNTP, 0,2 µM Reln-7F, 0,2 µM Reln-7R, 2,5 U AccuTaq LA DNA Polymerase™ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.) és 2 µl cDNS. A PCR hőmérsékleti profilja a következő volt: 2 perc 94 °C-on (elsődleges denaturáció), 35 darab 15 másodperces ciklus 94 °C-on (denaturáció), 30 másodperc 60°C-on (annealáció), 1 perc 68 °C-on (extenzió) és 5 perc



1. ábra: A tanulmány összeállításának vázlatos bemutatása

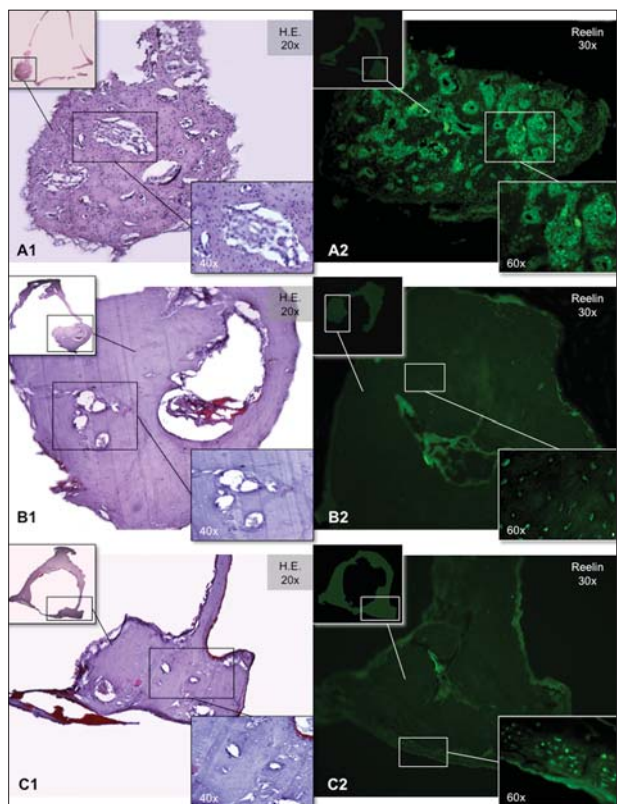
68°C-on (végső extenzió). Minden vizsgálat során beállítottunk egy negatív kontroll RT-PCR elegyet, amelyben a cDNS-t DNS-mentes víz helyettesítette. A RELN mRNS RT-PCR-rel történő kimutatásának belső kontrolljaként h36B4+ (5'-3': AGA TGC AGC AGA TCC GCA T) és h36B4- (5'-3': ATA TGA GGC AGG AGT TTC TCC AG) elnevezésű, saját tervezésű primereket alkalmaztunk, amelyek az emberi riboszómális RNS-t célozzák (háztartási gén-kontroll RT-PCR).

Reelin-specifikus immunofluoreszcens vizsgálat (IFA)

Az ankyloticus stapes talp minták másik részét (n=22), a corticalis csontmintákat (n=2), az incust (n=1) és két agymintát (n=2) 10%-os (w/v) formalin oldatban fixáltuk (1. ábra). A stapes talpakat és a kontrollként alkalmazott csontmintákat 0,5 M Na-EDTA oldatban dekalcináltuk, amely 0,02% (w/v) nátrium-azidot is tartalmazott (72 óra, 4°C). Az agyszövet mintákat természetesen nem kezeltük Na-EDTA-val. A mintákat 15%-os (w/v) analitikai tisztaságú zselatinba ágyztuk (24 óra, 56 °C) és 4%-os (w/v) paraformaldehid oldatban újrafixáltuk (24 óra, 20 °C). A szövettani blokkokat krioprotekció céljából 20%-os (w/v) répacukor oldatba helyeztük (2 óra, 4 °C), majd 10 µm vastagsággal -25°C-os hőmérsékleten lemetstettük (MNT-200, Slee, Mainz, Germany). Az úszómetseteket a festésig 0,1 M PBS-oldatban tároltuk, amely 0,03% (w/v) nátrium-azidot tartalmazott (4 °C). Minden mintából 2 párhuzamos, 10 µm vastagságú fagyasztva-metszett sorozatot készítettünk, amelyeket a következők szerint vizsgáltunk:

- hagyományos hematoxilin-eozin festés (HE),
- relin-specifikus immunofluoreszcens vizsgálat (IFA).

Az első metszetsorozatot a korábbiakban már többször leírt hagyományos hematoxilin-eozin módszerrel festettük. A második metszetsorozatot alaposan átmostuk, majd számár normál szérumot tartalmazó 0,2 M PBS-oldattal blokkoltuk (SC-2044, Santa Cruz, CA, USA). A protein-blokkolt metszeteket 1:200 hígítású poliklonális kecske anti-embéri relin primer antitesttel inkubáltuk (20°C, 48 óra, folyamatos rázatás) (SC-32554, K-15, Santa Cruz, CA, USA). A nem kötődött primer antitest felesleget 0,2 M PBS-oldattal mosás révén eltávolítottuk. A metszeteket ezután 1:300 hígítású számár anti-kecske FITC-jelölt másodlagos IgG-oldattal inkubáltuk (20 °C, 12 óra, folyamatos rázatás) (SC-2024, Santa Cruz, CA, USA). A tárgylemezre úsztatott metszeteket UV transzparens fedőanyaggal fedtük le (Vectashield™, Vector Labo-



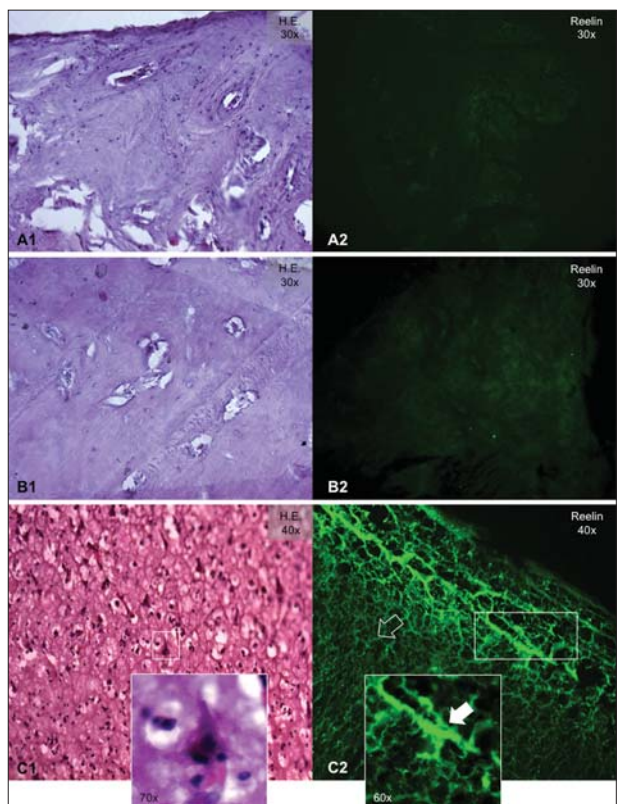
2. ábra: A reelin expresszió immunfluoreszcens vizsgálata a csontspecifikus kontrollokban és agyszövetmintákban
A1: Incus, amelynek csontszerkezete normális elrendeződésű cementvonalakat és ereket.
A2: A reelin-specifikus immunreakció negatív.
B1: A hallójárat hátsó csontos falából származó corticalis csontfragmentum.
B2: Reelin expresszió nem mutatható ki.
C1: Emberi agykéreg, amelyet a gyrus temporalis superior területéről távolítottunk el. Összetett axonális- és dendritikus hálózat figyelhető meg. A beillesztett kép egy élénk bazofil festődést mutató piramissejtet ábrázol.
C2: Az előző metszet reelin-specifikus immunfluoreszcens reakciója. A neurogliális elemek (astrocyták és oligodendrocyták) erőteljes reelin expressziót mutatnak. A reelint kifejező oligodendroglialis komplexumot üres nyíl mutatja. A kis kép egy reelin-pozitív astrocytát ábrázol (fehér nyíl).

ratories, CA, USA). A mikroszkópos fényképeket UV-fény alatt (510 nm), 69-87 msec expozíciós időt alkalmazva készítettük el. A képeket jpeg formátumban archiváltuk (Axioskop2 MOT™, Axiovision 3.0™, Zeiss, Jena, Germany). A szövettani vizsgálatokat kettős vak rendszerben végeztük: Cs.P. elemezte a HE festett metszeteket, míg az IFA elemzést K.T. végezte el.

Eredmények

Összefoglalva, a stapedectomy során eltávolított ankyloticus stapes talp mintákat (n=85), a corticalis csontfragmentumokat (n=4), a hallócsontmintákat (n=2) és az emberi agyszövetmintákat (n=4) RELN-specifikus RT-PCR és reelin-specifikus immunfluoreszcens vizsgálatoknak vetettük alá (1. ábra).

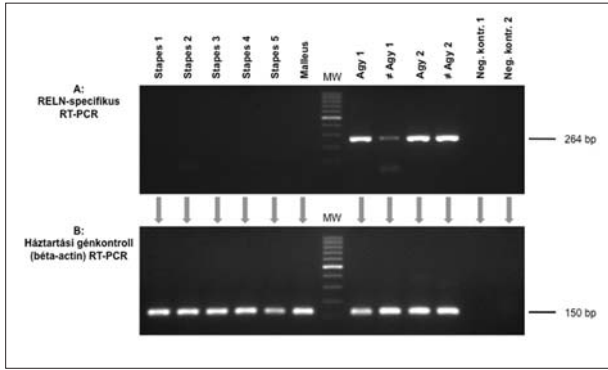
Reelin-specifikus immunfluoreszcens vizsgálat (IFA)
Az irodalomban fellelhető korábbi tudományos eredményekhez hasonlóan, a pozitív kontrollként alkalmazott emberi agyszövetminták nagyon intenzív citoplazmatikus reelin expressziót mutattak az immunfluoreszcens vizsgálat során (2. ábra), (1. táblázat). Az oligodendrocyták és az astrocyták meglehetősen intenzív immunreakciót adva kirajzolták a neurogliális háló összetett



3. ábra: A reelin expresszió immunfluoreszcens vizsgálata különböző okból kialakult stapes fixációkban
A1: Aktív otosclerosis hypercellularis osteoid alapállománnyal és számos osteolyticus lakunával.
A2: Az otosclerosis góc intenzív, granuláris reelin-specifikus immunreakciót mutat. B1: Inaktív otosclerosis góc a stapes talp első pólusában. A léziót hypocellularitás, üres sejttérnyékok és nagy pseudo-vascularis osteolyticus lakunák jellemzik.
B2: A léziót alkotó sejtek maradványai gyenge citoplazmatikus immunreakciót adnak. C1: Annuláris kalcifikáció hypocellularis és tömeges stapes talp pólusokkal.
C2: Az osteocytákat gyenge reelin expresszió jellemzi, amely hasonló az inaktív otosclerosis esetén tapasztaltakhoz. Ezzel szemben, a stapes vestibularis felszínének hyalinporc rétegében lévő chondrocyták élénk immunfluoreszcenciát mutatnak (kis kép).

I. táblázat: A reelin adhézios fehérje expressziója az ankyloticus stapes talpakban és a szövetspecifikus kontroll mintákban

Szövettani minták (H.E., n=25)	Reelin-specifikus IFA ¹
Stapes (n=22)	
Otosclerosis (n=14, 63,6%)	
■ Aktív (n=9, 64,3%)	++++
■ Inaktív (n=5, 35,7%)	++
Nem-otosclerosis stapes fixáció (n=8, 36,3%)	
■ Annuláris kalcifikáció (n=8, 100%)	++
Kontroll minták (n=5)	
Corticalis csontfragmentumok (n=2)	—
Incus (n=1)	—
Agyszövet (n=2)	++++
¹ IFA: Immunfluoreszcens vizsgálat (Immunofluorescent Assay). Az IFA intenzitásadatai a következők: ++: gyenge annuláris immunreaktivitás; +++: gyenge homogén immunreaktivitás; ++++: erős homogén vagy gyenge granuláris immunreaktivitás; ++++: erős konfluáló vagy intenzív granuláris immunreakció; —: negatív reakció	



4. ábra: Az RT-PCR amplimerek agaróz gélelektroforézise
A: A RELN-eredetű mRNS RT-PCR amplifikációja ankyloticus stapes talpban, malleus- és emberi agyszövetmintákban. A RELN mRNS a csontmintákban nem volt kimutatható, míg az agyszövetben erős amplifikációs reakciót adott, amelyet a 263 bp méretű amplimerek jelenléte igazol.
B: Az előző minták háztartási gén kontroll RT-PCR vizsgálata. Minden minta pozitív reakciót adott az emberi riboszomális RNS-re nézve (150 bp).

szerkezetét (2. ábra). Érdekes módon, az ankyloticus stapes talpban szintén tapasztaltunk reelin expressziót az IFA-vizsgálat során, amelynek meglete nem függött a stapes fixáció pontos szövettani diagnózisától (otosclerosis vs nem-otosclerosis stapes fixáció) (3. ábra), (1. táblázat). A reelin expresszióban észlelt individuális különbségek kizárólag a patológiásan átépült stapes talp sejtdúságával mutattak összefüggést (3. ábra), (1. táblázat). A legerősebb reelin-specifikus immunreakciót a stapes talp vestibularis felszínének hyalinporc rétegében észleltük, míg a stapes szuperstruktúra negatív volt a reelinre nézve (3. ábra). Ezzel szemben, a csontspecifikus kontrollként alkalmazott corticalis csontfragmentumokat és az incus mintát negatív reelin-specifikus immunreakció jellemezte (2. ábra), (1. táblázat).

RELN mRNS-specifikus RT-PCR

Az emberi riboszomális RNS-t negyvenhét RT-PCR során vizsgált ankyloticus stapes talpban (n=47), és az összes szövet-specifikus kontrollban (n=5) kimutattuk (4. ábra), (2. táblázat). Ez az eredmény megerősítette, hogy az általunk használt nukleinsav extrakciós protokoll megfelelően működött. A tizenhat negatív celluláris kontroll RT-PCR eredménnyel jellemzett ankyloticus stapes talpat azonban kizártuk a további vizsgálatok sorából (2. táblázat). A pozitív kontrollként alkalmazott emberi agyszövetmintákban egyértelmű RELN mRNS pozitivitást tapasztaltunk az RT-PCR során (4. ábra), (2. táblázat). Ezzel a megfigyeléssel szemben, az ankyloticus stapes talpban és a csontspecifikus kontroll mintákban nem tudtuk kimutatni a RELN génről átiródott RNS-t (4. ábra), (2. táblázat).

Megbeszélés

Tanulmányunk nem más kutatócsoportok eredményeinek cáfolata végett jött létre. Tekintettel azonban az ellentmondásos adatokra, célunk a RELN génről átiródott mRNS és a reelin fehérje szövetspecifikus expressziójának pontos leírása volt az ankyloticus stapes talpban. A jelen munka nagy jelentőséggel bír, hiszen a közelmúltban több lenyűgöző és új eredmény jelent meg az emberi stapes talpban megjelenő reelin expresszióról, amely bizonyos körülmények között az otosclerosis genetikai alapjál szolgálhat (18, 28, 29, 30). Eredményeink alapján, a RELN/reelin expresszió egyértelműen kizárható az ankyloticus stapes talp szövetspecifikus kontrolljaként alkalmazott incus, malleus és corticalis csontmintákban. Ezek az eredmények nem meglepők, hiszen a reelin expressziót eddig kizárólag neurális-, illetve „neural-associated” szövetekben írták le (agy, ganglionok, retina és odontoblastok) (20, 27). Ennek megfelelően, a kontroll min-

2. táblázat: A RELN mRNS expressziója az ankyloticus stapes talpban és a szövetspecifikus kontroll mintákban

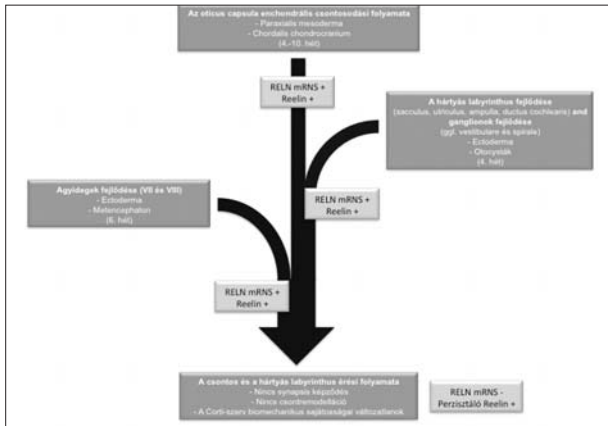
Szövetminták (n=68)	Háztartási géntest RT-PCR ¹	RELN mRNS-specifikus RT-PCR
Ankyloticus stapes talp (n=63)	47	0
Corticalis csontfragmentumok (n=2)	2	0
Emberi agyszövet (n=2)	2	2
Malleus (n=1)	1	0

¹Háztartási géntest RT-PCR: Housekeeping control RT-PCR – ebben a reakcióban az emberi béta-actin gén expresszióját vizsgáljuk, amely univerzálisan kifejeződő fehérjeként az mRNS expresszió hasznos referencia kontrollja.

takat illetően, eredményeink nyilvánvaló párhuzamot mutatnak a korábbi tanulmányok reelinre vonatkozó szöveti expressziós adataival (20, 22, 27). Meglepetésünkre, jelentős ellentét igazolódott a RELN mRNS és a reelin expresszió között az ankyloticus stapes talpban: az mRNS-t – amely aktív transzkripcióra utal – nem sikerült kimutatnunk, míg a reelin fehérje viszonylag erős immunreakciót adott az IFA során!

Van Camp és munkatársai számos, a RELN gént érintő SNP-t mutatott ki, amelyek véleményük szerint szoros asszociációt mutatnak az otosclerosis patogenezisével (18, 28, 29). Azonban a jelen tanulmány és az említett közlemények között mutatkozik egy nem elhanyagolható, mondhatni stratégiai jelentőségű különbség. Van Camp és munkatársai minden klinikailag stapes fixációval jellemzett beteg esetén felállították az otosclerosis diagnózisát úgy, hogy az esetek egy jelentős részében műtét nem történt, tehát intraoperatív lelet sem állt rendelkezésre; mindezzel, szövettani vizsgálatot (érthető műtéti technikai okokból) egyáltalán nem végeztek (18). A stapes talp szövettani vizsgálatának elmaradása a sebészeti technikával magyarázható: a stapedotomia nem alkalmas a fixációt okozó stapes talp fragmentumok eltávolítására. Rendkívül fontosnak tartottuk, hogy az ankyloticus stapes talpban együttesen vizsgáljuk a RELN mRNS és a reelin fehérje expresszióját, ugyanis enélkül a vérből végzett SNP asszociációs vizsgálatok eredményei kizárólag statisztikai adatok lennének, amelyek tényleges etiológiai összefüggést nem igazolnak (18). Első közleményünkben, Schrauwen és munkatársai saját tervezésű RELN-specifikus primereket alkalmaztak az egészséges emberi stapes talpban történő RELN expresszió bizonyítására: RELNex61.62F (5'-3': TACGCCCATGGAGACTCACT) és RELNex61.62R (5'-3': CCGTTGTTGACGCTGTATTC) (az eredeti közleményben a primer szekvenciákat nem tették közzé, jelen közlésük Ealy Megan PhD szíves hozzájárulásával történik) (18). Meglepetésünkre azonban, a primerpár online virtuális elemzésével (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) nem tudtuk kimutatni RELN-eredetű mRNS-t! Valószínűleg jóhiszemű primertervezési hiba történt, amely megtévesztően téves eredmények extrapolációjával járt.

Úgy gondoljuk, hogy a RELN/reelin expresszió emberi stapes talpban észlelhető ellentmondásait a capsula otica sajátos metabolikus és fejlődéstani jellegzetességei magyarázhatják (5. ábra). Lévéen egy igen speciális csont az emberi vázrendszerben, a capsula otica két agyideget és azok ganglionjait (n. VII és n. VIII.), valamint számos neuroectodermális elemet (hártyás labirintus, Cort-szerv, ganglion spirale) foglal magába (19). Ezek a képletek az embrionális fejlődés korai szakaszában nagy valószínűséggel a reelin „escort” funkcióját igénylik a megfelelő anatómia lokalizáció



5. ábra: Az emberi oticus capsulában észlelt variábilis RELN/reelin expresszió hipotetikus modellje

és szinapszisképződés eléréséhez (19). Fontos hangsúlyoznunk, hogy legalábbis fejlődéstani szempontból, a stapes talp a capsula otica alapvető részét alkotja (1). Az embrionális fejlődés későbbi szakaszaiban az aktív RELN mRNS expresszióra valószínűleg nincs tovább szükség, hiszen a szinapszisképződés és a neuronális integráció teljesen befejeződik a capsula oticán belül (1, 19). Továbbmenve, a capsula oticában a posztembrionális csontremodeláció is teljesen hiányzik, amely biztosítja a Corti-szerv változatlan biomechanikai tulajdonságait (1). Végül, a kérdést molekuláris biológiai szempontból is megközelíthetjük. A reelin egy extrém nagyméretű struktúrféherje (~3500 AA), amely hosszú félelet-ideával rendelkezik, és anélkül, hogy expressziójához aktív mRNS transzkripció társulna, bizonyos szinten képes az egész élet során perzisztálni (21, 22). Mindazonáltal, az emberi stapes talpakban (ankyoticus, egészséges) észlelt reelin perzisztencia egy összetett kérdést vet fel: mi lehet a szerepe az otosclerosisos csontátépítési zavar patogenezisében egy olyan fehérjének, amely az axonfejlődést és a szinapszisképződést koordinálja az embrionális életben? Természetesen hipotézisünk további megerősítést és szisztematikus tanulmányok elvégzését igényli a közeljövőben (5. ábra). Összefoglalva, a RELN-specifikus mRNS expresszió egyértelműen kizárható az ankyoticus stapes talpakban és a szövetspecifikus kontroll mintákban is. A passzív reelin expresszió ellenére, jelen megfigyeléseink megkérdőjelezzik a genetikai összefüggést a RELN-specifikus SNP-k és az otosclerosis patogenezise között. Eredményeink tükrében úgy gondoljuk, hogy további tanulmányok szükségesek a RELN/reelin expressziós rendszer szerepének tisztázására az otosclerosis patofiziológiájában.

Köszönetnyilvánítás

Jelen dolgozatunk Csomor P és mtsai: *Controversies in RELN/Reelin expression in otosclerosis* (Eur Arch of Otorhinolaryngol 2012; 269 (2): 431–440.) című munkájának másodközléseként jelenik meg. Az ábrák és táblázatok ismételt felhasználása a Springer Kiadó írásos engedélyével történt (engedélyszám: 2852360325785).

Köszönettel tartozunk Dr. Lektor Bálint osztályvezető főorvos úrnak (Bajcsy-Zsilinszky Kórház, Fül-Orr-Gége Osztály, Budapest) és Dr. Molnár Péter professzor úrnak (DEOEC, Patológiai Intézet), akik a stapes és agyszövetminták gyűjtése során önzetlen segítséget nyújtottak kutatócsoportunknak.

Munkánk az Országos Tudományos Kutatási Alapprogramok (OTKA PD75371, K81480) és a Debreceni Egyetem (DE OEC Mec 17/2008) pályázatainak anyagi támogatásával készült.

Irodalom

1. Karosi T, Szekanez Z, Sziklai I. Otosclerosis: an autoimmune disease? Autoimmun Rev 2009; 9 (2): 95–101.

2. Karosi T, Csomor P, Petkó M, et al. Histopathology of nonotosclerotic stapes fixations. Otol Neurotol 2009; 30 (8): 1058–1066.
3. Lehnerdt G, Metz KA, Trellakis S, et al. Signaling by way of type IB and II bone morphogenetic protein receptors regulates bone formation in otospongiosis. Laryngoscope 2007; 117 (5): 812–816.
4. Lehnerdt G, Unkel C, Metz KA, et al. Immunohistochemical evidence of BMP-2, -4 and -7 activity in otospongiosis. Acta Otolaryngol 2008; 128 (1): 13–17.
5. Karosi T, Szalmás A, Csomor P, et al. Disease-associated novel CD46 splicing variants and pathologic bone remodeling in otosclerosis. Laryngoscope 2008; 118 (9): 1669–1676.
6. Csomor P, Szalmás A, Kónya J, et al. Restriction analysis of otosclerosis-associated CD46 splicing variants. Eur Arch Otorhinolaryngol 2010; 267 (2): 219–226.
7. McKenna MJ, Kristiansen AG, Haines J. Polymerase chain reaction amplification of a measles virus sequence from human temporal bone sections with active otosclerosis. Am J Otol 1996; 17 (6): 827–830.
8. Arnold W, Nedermeyer HP, Lehn N, et al. Measles virus in otosclerosis and the specific immune response of the inner ear. Acta Otolaryngol 1996; 116 (5): 705–709.
9. Imauchi Y, Jeunemaître X, Boussion M, et al. Relation between renin-angiotensin-aldosterone system and otosclerosis: a genetic association and in vitro study. Otol Neurotol 2008; 29 (3): 295–301.
10. Schrauwen I, Thys M, Vanderstraeten K, et al. No evidence for association between the renin-angiotensin-aldosterone system and otosclerosis in a large Belgian-Dutch population. Otol Neurotol 2009; 30 (8): 1079–1083.
11. Van Den Bogaert K, Govaerts PJ, De Leenheer EM, et al. Otosclerosis: a genetically heterogeneous disease involving at least three different genes. Bone 2002; 30 (4): 624–630.
12. Tomek MS, Brown MR, Mani SR, et al. Localization of a gene for otosclerosis to chromosome 15q25-q26. Hum Mol Genet 1998; 7 (2): 285–290.
13. Thys M, Van Den Bogaert K, Iliadou V, et al. A seventh locus for otosclerosis, OTSC7, maps to chromosome 6q13-16.1. Eur J Hum Genet 2007; 15 (3): 362–368.
14. Van Den Bogaert K, Govaerts PJ, Schatteman I, et al. A second gene for otosclerosis, OTSC2, maps to chromosome 7q34-36. Am J Hum Genet 2001; 68 (2): 495–500.
15. Van Den Bogaert K, De Leenheer EM, Chen W, et al. A fifth locus for otosclerosis, OTSC5, maps to chromosome 3q22-24. J Med Genet 2004; 41 (6): 450–453.
16. Chen W, Meyer NC, McKenna MJ, et al. Single-nucleotide polymorphisms in the COL1A1 regulatory regions are associated with otosclerosis. Clin Genet 2007; 71 (5): 406–414.
17. Thys M, Schrauwen I, Vanderstraeten K, et al. The coding polymorphism T263I in TGF-beta1 is associated with otosclerosis in two independent populations. Hum Mol Genet 2007; 16 (17): 2021–2030.
18. Schrauwen I, Ealy M, Huentelman MJ, et al. A genome-wide analysis identifies genetic variants in the RELN gene associated with otosclerosis. Am J Hum Genet 2009; 84 (3): 328–338.
19. Nielsen KB, Søndergaard A, Johansen MG, et al. Reelin expression during embryonic development of the pig brain. BMC Neurosci 2010; 15 (11): 75.
20. Roberts RC, Xu L, Roche JK, et al. Ultrastructural localization of reelin in the cortex in post-mortem human brain. J Comp Neurol 2005; 482 (3): 294–308.
21. DeSilva U, D'Arcangelo G, Braden VV, et al. The human reelin gene: isolation, sequencing, and mapping on chromosome 7. Genome Res 1997; 7 (2): 157–164.
22. Förster E, Bock HH, Herz J, et al. Emerging topics in Reelin function. Eur J Neurosci 2010; 31 (9): 1511–1518.
23. Persico AM, D'Agruma L, Maiorano N, et al. Collaborative Linkage Study of Autism. Reelin gene alleles and haplotypes as a factor predisposing to autistic disorder. Mol Psychiatry 2001; 6 (2): 150–159.
24. Hong SE, Shugart YY, Huang DT, et al. Autosomal recessive lissencephaly with cerebellar hypoplasia is associated with human RELN mutations. Nat Genet 2000; 26 (1): 93–96.
25. Wedenoja J, Loukola A, Tuulio-Henriksson A, et al. Replication of linkage on chromosome 7q22 and association of the regional Reelin gene with working memory in schizophrenia families. Mol Psychiatry 2008; 13 (7): 673–684.
26. Fatemi SH, Snow AV, Strydom JM, et al. Reelin signaling is impaired in autism. Biol Psychiatry 2005; 57 (7): 777–787.
27. Maurin JC, Couble ML, Didier-Bazes M, et al. Expression and localization of reelin in human odontoblasts. Matrix Biol 2004; 23 (5): 277–285.
28. Schrauwen I, Ealy M, Franssen E, et al. Genetic variants in the RELN gene are associated with otosclerosis in multiple European populations. Hum Genet 2010; 127 (2): 155–162.
29. Khalfallah A, Schrauwen I, Mnaja M, et al. Genetic variants in RELN are associated with otosclerosis in a non-European population from Tunisia. Ann Hum Genet 2010; 74 (5): 399–405.
30. Priyadarshi S, Panda KC, Panda AK, et al. Lack of association between SNP rs3914132 of the RELN gene and otosclerosis in India. Genet Mol Res 2010; 9 (3): 1914–1920.